лебных факторов / А.М. Белобороденко, Т.А. Белобороденко // Влияние антропогенных факторов на структурные преобразования клеток, тканей, органов человека и животных; Волгоград, 1995. С. 14.
4. Белобороденко, А.М. Морфофункциональное состояние слизистой оболочки матки у коров в условиях гиподинамии / А.М. Белобороденко, П.В. Дунаев, М.А. Белобороденко // Новые аспекты аграрного образования от производства к развитию сельских территорий. Тюмень, 2000, С. 89-92.
5. Белобороденко, А.М. Профилактика бесплодия и послеродовых осложнений у коров / А.М. Белобороденко, П.В,Дунаев // Вестник ТГСХА, 2002. № 1. С. 103-112.

УДК: 619:615.28

К.В. Гаврилин

Всероссийский институт гельминтологии им. К.И. Скрябина

МИКРОБИОЦЕНОЗ ТРОПИЧЕСКИХ РЫБ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Введение

Одними из наиболее распространенных и опасных патологий рыб являются бактериальные заболевания [1, 2, 3]. В нашей стране уделяется большое внимание изучению бактериозов рыб, но подавляющее большинство исследований касается видов, выращиваемых для пищевых целей. При этом практически не уделяется внимание изучению бактериальных болезней декоративных тропических рыб, хотя в настоящее время на территорию РФ завозится большое количество этих гидробионтов.

В связи с этим, существует возможность интродукции на территорию РФ новых видов патогенных для рыб микроорганизмов и их адаптации в отечественных экосистемах. В мире хорошо известны случаи резкого ухудшения эпизоотической ситуации на рыбоводных хозяйствах из-за распространения бактериальных патогенов [4, 5]. Изучение количественного и качественного состава микрофлоры завозимых рыб позволит оценить эту опасность.

Аквариумное рыбоводство является одним из наиболее динамично развивающихся и прибыльных секторов отечественной аквакультуры и нуждается в значительных количествах тропических рыбок. Поэтому исследование характерных для них микробных ассоциаций может в значительной мере способствовать развитию методов и технологий сохранения их здоровья и высоких декоративных качеств.

В связи с этим, целью нашей работы было изучить качественный и количественный состав микрофлоры поверхности тела и внутренних органов декоративных рыб в норме и при некоторых часто встречающихся патологиях.

Материалы и методы

Исследованию подвергали рыб различных видов: меченосцев (Xiphophorus helleri), пецилий (Poecilia velitera), моллинезий (Poecilia sphenops), гурами (Trichogaster trichopterus) и ляляусов (Colisa lalia), завезенных на территорию РФ из стран Юго-восточной Азии. Не позднее чем, через 24 часа после доставки и размещения рыб на карантин из партии рыб случайным образом отбирали 5 экз. и подвергали микробиологическому исследованию.

Первоначально с 0,5 см^2 поверхности тела рыбы стерильным тампоном брали соскоб, который помещали в 5 мл стерильного физиологического раствора и после его взбалтывания делали высев на плотную питательную среду – мясопептонный агар (МПА).

Затем рыбу асептически вскрывали и иссекали 0,02 г материала печени, который помещали в 0,2 мл стерильного физиологического раствора и многократным пипетированием суспензировали. Из полученной суспензии микродозатором со стерильным наконечником делали высев по 0,05 мл на плотные питательные среды МПА и Эндо. Исследование других внутренних органов и крови не проводили, так как при посеве материала из печени рыб существует наибольшая вероятность обнаружения микрофлоры, как при бессимптомном бактерионосительстве, так и при септических процессах [6].

Количество колоний, выросших на

Таблица 1

Микробиоценоз рыб при их нормальном физиологическом состоянии

Вид рыб	Кол-во исследованных, экз.	Поверхность тела		Внутренние органы
		Кол-во, КОЕ/см²	Состав микрофлоры	Кол-во, КОЕ/г
Colisa lalia	15	6,8±2,6	**Aeromonas.sp.**	0,0
Trichogaster trichopterus	20	8,8±2,9	Acinetobacter calcoaceticus	0,0
Poecilia sphenops	10	6,6±2,6	**Asp.**	0,0
Poecilia velifera	25	11,3±3,4	**90% Acinet. calcoaceticus,** **10**% Staphylococcus **epidermidis**	0,0
Xiphophorus helleri	20	9,3±3,0	**90% Acinet. calcoaceticus, 10% Staph. epidermidis**	0,0

Таблица 2

Микробиоценоз рыб, пораженных бактериальными инфекциями

Вид рыб	**Кол-во исследованных, экз.**	**Поверхность тела**		**Внутренние органы**	
		Кол-во, КОЕ/слг²	**Состав микрофлоры**	**Кол-во, КОЕ/г**	**Состав микрофлоры**
Colisa lalia	5	7,9±2,8	Escherichia coli	104,0±10,1	E. coli
Trichogaster trichopterus	5	27,5±5,2	**Moraxella sp.**	286,0±16,9	**M. sp.**
Poecilia sphenops	5	8,6±2,9	Slaph **epidermidis**	249,6±15,8	**80% A.sp., 20%Msp.**
Xiphophorus helleri	5	60,0±7,7	**40% M. sp., 40% Acinet. calcoaceticus, 15%БГКП», 5% Staph. epidermidis**	100,0±10,0	БГКП

Примечание: * - бактерии группы кишечной палочки

чашке Петри с плотной питательной средой, подсчитывали. Результат представляли в виде КОЕ/см² (колониеобразующие единицы на 1 см² поверхности тела) или КОЕ/г (в 1 г печени).

Образование индола учитывали мо методу Синева [7], а наличие цитохромоксидазы по Эрлиху [8]. Отношение к окраске по Граму определяли тестом с 3% КОН.

Идентификацию выделенных бактериальных штаммов проводили при помощи «Определителя бактерий Берджи» [9] и руководства по изучению энтеробактерий Ф. Кауфмана [10].

Изучение клинической и патологоанатомической картин проводили согласно методикам, изложенным в практикуме по изучению болезней рыб [6], а паразитологическое вскрытие – согласно рекомендациям по изучению болезней рыб [11].

Результаты и обсуждение

Первоначально исследовали группы рыбок, у которых при помещении на карантин не отмечено никаких болезненных симптомов и в результате полного паразитологического вскрытия не обнаружено паразитов.

В течение срока карантина (28 суток) эти группы рыбок не демонстрировали ни каких отклонений от нормы, и после первичной адаптации к новым условиям (обычно 1–3 суток) активно потребляли корм, а их поведение соответствовало видовым особенностям.

Таким образом, можно полагать, что обнаруженные в результате исследования микробные композиции (табл. 1) характеризуют нормофлору этих видов рыб.

При анализе данных, представленных в таблице, в первую очередь обращает на себя внимание тот факт, что из внутрен-

Таблица 3

Микробиоценоз рыб, пораженных простейшими эктопаразитами

Вид рыб	Кол-во	Поверхность тела		Внутренние органы	
	исследованных, экз.	Кол-во, КОЕ/см²	Состав микрофлоры	Кол-во, КОЕ/г	Состав микрофлоры
Colisa lalia	5	260,0±2,3	30% E. coli, 30% A. sobria, 30% Flavobacteriura sp. и единичные Staph. epidermidis	44,3±6,6	50% E. coli, 50% A. sobria
Trichogaster trichopterus	**5**	286,0±16,9	M.sp.	27,4±5,2	Msp.
Poecilia sphenops	5	130,4±11,4	40%M.sp.,40% A sp., 20% Acinet. calcoaceticus	41,1±4,1	50%M.sp., 50% A. sp
Poecilia velifera	5	95,8±9,7	60% A. sp., 40 % Acinet. calcoaceticus	40,4±2,6	50%A. sp, 20% Enterobacter sp., 10% Eschenchia coli, 10% Proteus vulgaris. 10% Staph. **cpiacrnuuis**
Xiphophorus helleri	5	98,6±9,9	50% M.sp., 50% Acinet. calcoaceticus	120,0±10,6	Msp.

них органов, находящихся в нормальном физиологическом состоянии рыб, не удается выделить микрофлору. Эти данные полностью совпадают с результатами, полученными при многолетних исследованиях товарных рыб. Авторы указывают на то, что в норме внутренние органы рыб, стерильны, а их контаминация микрофлорой является результатом серьезных физиологических дисфункций [12,13,14].

На поверхности тела рыб находятся единичные микроорганизмы, среди которых доминируют неферментирующие щелочеобразователи (НФЩ) и аэромонады. Учитывая то, что микробная композиция поверхности тела рыб сильно зависит от состава микрофлоры водьг, где обитает рыба, [15, 16] различия в качественном составе бактерий определяются условиями в каждом конкретном рыбоводном хозяйстве. В целом анализ состава микробиоценоза (подавляющее преобладание грамнегативной микрофлоры и наличие санитарно-показательных стафилококков) характеризует санитарное состояние хозяйств, где эти рыбы были выращены как неудовлетворительное. Все выделенные микроорганизмы являются с одной стороны условно патогенными для рыб, но в небольших количествах не представляют опасности для гидробионта. Согласно литературным данным, грамотрицательная микрофлора, находящаяся в динамическом равновесии с макроорганизмом (при его нормальном физиологическом состоянии), не только не причиняет ущерба, но и способна приносить рыбе пользу, например, синтезировать противовирусные вещества.

Вторым этапом нашей работы явилось исследование микробиоценоза рыб, которые на момент обследования имели симптомы, характерные для бактериальных септицемии (кровоизлияния в плавники, на поверхности тела и в белковую оболочку глаз, язвы различной формы и локализации, асцитный синдром). Результаты исследования представлены в таблице 2.

Выявленные у рыб симптомы явились следствием их поражения условно-патогенными микроорганизмами, которые в значительном количестве были выделены из печени. Обращает на себя внимание тот факт, что в ряде случаев обсемененность поверхности тела возрастает незначительно или остается в пределах нормы. Это объясняется тем, что существует два основных пути развития бактериальных инфекций, вызванных факультативными патогенами.

При экзогенном пути развития условно-патогенные микроорганизмы на-

капливаются в воде, колонизируют поверхность тела рыб и при накоплении некого «критического» количества, проникают во внутренние органы. Входными воротами инфекции в данном случае служат различные травмы, приводящие к нарушению целостности покровных тканей. При таком пути развития инфекции наряду с контаминацией внутренних органов, большое количество бактерий обнаруживается на поверхности тела.

В случае эндогенного пути развития вирулентные возбудители накапливаются в кишечнике рыб, а входными воротами служит его слизистая оболочка. При этом на определенной стадии болезни, когда еще не успели развиться серьезные язвенные поражения и некротические изменения в покровных и мышечных тканях, микрофлора поверхности тела может не отличаться от таковой у здоровых рыб.

Следует отметить, что микробные композиции, находящиеся на поверхности тела и в воде не всегда совпадают с выделенными из внутренних органов. Это можно объяснить различной способностью бактериальных штаммов продуцировать вещества, обеспечивающие разрушение соединительных тканей, повреждение клеток хозяина, защиту от его иммунных факторов и т.д. Но наличие микробного штамма во внутренних органах не может однозначно свидетельствовать о его высокой вирулентности. В некоторых случаях при сильных неблагоприятных воздействиях на рыбу (частые ручные манипуляции, наличие токсического фона, хронической недостатке кислорода, наличии заразного заболевания и т.д.) из ее внутренних органов можно выделить сапрофитную микрофлору [17].

Так же исследованию подвергнуты группы рыб, которые на момент поступления на карантин имели симптомы поражения эктопаразитическими простейшими (повышенное отделение слизи, участки уплотненной слизи и серый налет на теле). При паразитологическом обследовании ляліусов выявлено поражение рыбок паразитическими инфузориями, идентифицированными как Trichodina nigra (экстенсинвазированность (ЭИ) – 100%, интенсинвазированность (ИИ) – 45,0±1,0 экз. в поле зрения микроскопа). Гурами являлись носителями жгутиконосцев рода Cryptobia (ЭИ – 30%, ИИ – 40,0±3,4 экз. п.з.). У меченосцев, пецилий и моллинезий обнаружены простейшие, отнесенные к роду Costia, ЭИ – 60%, ИИ – 39,0±4,5 экз в п.з.; ЭИ – 100%, ИИ 54,7±0,3 экз в п.з.; ЭИ - 50%, ИИ – 18,0±2,9 экз. в п.з. соответственно. Результаты изложены в таблице 3.

Все исследованные группы рыб имели повышенное количество микроорганизмов на поверхности тела, в среднем в 21,6 раза больше чем в норме. При этом во всех случаях отмечена контаминация внутренних органов. Таким образом, можно констатировать развитие септического бактериоза по экзогенному пути. Это связано с повреждением простейшими покровных тканей рыб – нарушением целостности защитных барьеров.

При дальнейшем наблюдении за исследованными рыбами отмечено, что клинические признаки, характерные для бактериальных поражений, прогрессировали, несмотря на элиминацию простейших соответствующими антипротозойными средствами, что свидетельствовало о дальнейшем развитии инфекции уже без участия простейших. Для излечения рыб приходилось использовать антибиотики.

Заключение

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы. У клинически здоровых тропических рыбок на поверхности тела находятся единичные микроорганизмы (6,6–11,3 КОЕ/см^2), не причиняющие вреда здоровью рыб, а внутренняя среда их организма свободна от бактериальной микрофлоры.

При наличии у рыб симптомов, характерных для септических бактериозов, из печени в значительных количествах (100,0–286,0 КОЕ/г) выделяются НФЩ, энтеробактерии и аэромонады. Обсемененность поверхности тела зависит от пути развития инфекции. Если она в пределах нормы (7,9–8,6 КОЕ/см^2) или несколько повышена (27,5 КОЕ/см^2), можно констатировать развитие септицемии по эндогенному пути. В других случаях, когда обсемененность поверхности тела значительно превышает норму, имеет место экзогенная инфекция.

При паразитировании простейших (Trichodina sp., Cryptobia sp., Costia sp.) обсемененность поверхности тела по сравнению с нормой возрастает в среднем в 21,6 раза и бактерии начинают обнаруживаться во внутренних органах рыб. В дальнейшем септический процесс развивается уже без участия простейших, у

рыб появляются симптомы, характерные для бактериальных заболеваний.

Видовой состав микрофлоры представлен в основном условно-патогенной для рыб грамнегативной микрофлорой. Поэтому можно говорить о том, что в результате проведенных исследований опасности заноса облигатных высоковирулентных патогенов не выявлено. Тем не менее, обилие потенциальных возбудителей требует принятия комплекса мер, направленных на сохранение здоровья и высоких товарных качеств закупаемой рыбы. Помимо этого, согласно данным ряда авторов, при взаимодействии с ослабленной рыбой в условиях экологического неблагополучия окружающей среды, факультативные патогены рыб (особенно аэромонады) способны становиться облигатными возбудителями [18]. Нельзя так же забывать и о проблеме антибиотикорезистентности бактерий и о потенциальной возможности заноса устойчивых штаммов.

Для успешного проведения карантинирования этих гидробионтов необходимо проводить комплекс микробиологических и паразитологических исследований. При обнаружении повышенных количеств бактерий на поверхности тела или единичных микроорганизмов во внутренних органах, не дожидаясь появления клинических признаков заболевания, использовать антибиотики. В случае поражения рыб простейшими, наряду с антипаразитарными средствами, целесообразно проводить антибактериальную терапию.

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование микробиоценоза рыб в норме и при различных патологиях. Установлено, что здоровые рыбы имеют на поверхности тела единичные бактерии (6,6–11,3 КОЕ/см²), а их внутренние органы свободны от микрофлоры. При септических бактериозах из печени рыб выделяется значительное количество бактерий (104,0–286,0 КОЕ/г). Паразитирование представителей родов Trichodina, Cryptobia и Costia сопровождается развитием экзогенного сепсиса.

SUMMARY

The microbiocenosis of tropic fish at norm and pathologic were studied. The surface at the body healthy fish have solitary bacterium (6,6–13,3 CFU/sm²). Internal organs were free from micro flora. There are a considerable account of bacterium (104,0–286,0 CFU/g) in the liver of fish at septic bacteriosis. Invasion of fish by Trichodina, Cryptobia and Costia accompanied by exogenous sepsis.

Литература

1. Ткаченко В.А., Сабодаш В.М., Цыба А.А. Основные болезни аквариумных рыб, М: АСТ; Донецк: Сталкер, 2005. 236 с.
2. Яременко Н.А., Селиверстов В.В. Анализ эпизоотической обстановки по заразным болезням рыб в Российской Федерации по итогам 2002 г. // Тез. науч.-практ. конф. «Проблемы патологии иммунологии и охраны здоровья рыб». М: Россельхозакадемия, 2003. С. 10-13.
3. Bassleer G. The new illustrated guide to fish diseases in ornamental tropical and pond fish. Westmeerbeec: Responsible publisher 2005. 232. p.
4. Юхименко Л.Н. Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Гаврилин К.В. Этиологическая структура аэромонад и её влияние на развитие эпизоотического процесса // Мат-лы. Межд. науч.-практ. конф. «Аквакультура начала XXI века: истоки, состояние, стратегия развития». М.: ВНИРО, 2002. С. 240-244.
5. Schaperclaus W. Fischkranheiten. // Berlin: Akademie Verlag, 1954. 708 s.
6. Мусселиус В.А., Ванятинский В.Ф., Вихман А.А. Лабораторный практикум по болезням рыб, М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983. 296 с.
7. Лабинская АС. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М: Медицина, 1978. 394 с.
8. Покровский В.И. Энтеробактерии (Руководство для врачей). М.: Медицина, 1985. 321 с.
9. Определитель бактерий Берджи. под ред. Дж. Хоулта., 1995 г. 600 с.
10. Кауфман Ф. Семейство кишечных бактерий (пер. с английского Доссер Е.М., Голубевой И.В.). М.: Медгиз, 1959. 354 с.
11. Проведение ихтиопатологических исследований - методические указания. М.: Россельхозиздат, 1968. 20 с.
12. Юхименко Л.Н., Викторова В.Ф. Аэромонады рыб / Сб. научн. тр./ Болезни рыб и борьба с ними. М.: ВНИИПРХ, 1979. Вып. 23. С. 37-55.
13. Трифонова Е.С., Бычкова Л.И., Юхименко Л.Н., Гаврилин К.В. Применение пробиотиков для компенсации воздействия агрессивных факторов водной среды при выращивании осетровых рыб в системах с замкнутым водоснабжением // Сб. тез. Всеросс. науч.-практ. конф. «Проблемы патологии, иммунологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов». М.: Россельхозакадемия, 2003. С. 130-131.
14. Рудиков НИ., Грищенко Л.И. Микрофлора и бактериальные болезни рыб // Ихтиология (Итоги науки и техники). М.: ВИНИТИ, 1985. Т.1. С. 93-160.
15. Bullook G.L., Conroy DA., Snieszko S.F. Bacterial diseases of fish (eds. Snieszko S.F., Axelord H.R.). Neptune city: T.F.H. Publications, 1972. 144 p.
16. Ларцева Л.В., Катунин Д.Н. Микрофлора рыб - биоиндикатор загрязнения дельты Волги / Сб. научн. тр. / Водные биоресурсы, воспр-во и экология гидробионтов. М.: ВНИИПРХ, 1993. Вып. 69. С. 155-163.
17. Юхименко Л.Н., Койдан Г.С., Бычкова Л.И., Смирнов Л.П. Биологические свойства аэромонад и их роль в патологии рыб // Рыбн. хоз.-во / Сер. Болезни гидробионтов в аквакультуре. Аналит. и реф. информ. М.: ВНИЭРХ, 2001. Вып. 1. С. 1-10.
18. Юхименко Л.Н., Койдан Г. С. Современное состояние проблемы аэромоноза рыб // Рыбн. хоз.-во / Сер. Аквакультура: Информ. пакет Болезни рыб. М.: ВНИЭРХ, 1997. Вып. 2. С. 1-5.